

L61 ANSWER 58 OF 101 HCAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN
 AN 1997:203703 HCAPLUS
 DN 126:185078
 ED Entered STN: 28 Mar 1997
 TI Sulfur-containing amino acids and their manufacture by using
 microorganisms
 IN Hatamoto, Osamu; Noguchi, Kaoru; Matsuyama, Akira; Ootake, Hideko; Nakano,
 Eiichi
 PA Chikyu Kankyo Sangyo Gijutsu K, Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 20 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 IC ICM C12P013-12
 ICS C12P013-12; C12N001-21; C07H021-04; C12N009-10; C12N009-88;
 C12N015-09; C12R001-19
 CC 16-2 (Fermentation and Bioindustrial Chemistry)
 Section cross-reference(s): 3, 10
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 09009982	A2	19970114	JP 1995-168931	19950704
PRAI	JP 1995-168931		19950704		

CLASS

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
JP 09009982	ICM	C12P013-12
	ICS	C12P013-12; C12N001-21; C07H021-04; C12N009-10; C12N009-88; C12N015-09; C12R001-19
	IPCI	C12P0013-12 [ICM,6]; C12P0013-12 [ICS,6]; C12N0001-21 [ICS,6]; C07H0021-04 [ICS,6]; C12N0009-10 [ICS,6]; C12N0009-88 [ICS,6]; C12N0015-09 [ICS,6]; C12R0001-19 [ICS,6]

AB Disclosed is a method for the production of S-containing amino acids by
 cultivation of microorganisms that express the genes for serine acetyl
 transferase (**gene cysE**), phosphotransacetylase (**gene**
 pta), and O-acetylserine lyase (**gene cysK**) in a medium
 containing serine, sulfides, acetyl CoA, and acetyl phosphoric acid.
 Recombinant bacteriophage λ 501CYSxPTA carrying **genes**
 cysE, **cysK**, and pta was prepared and used for the transformation
 of Escherichia coli strain 1100. The transformant was able to
 produce S-containing amino acids at a level of 1.2 mM/30 min., as compared to
 0.6 o that of the control.

ST fermn sulfur contg amino acid; Escherichia recombinant sulfur contg amino
 acid

IT Gene, microbial

RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES
 (Uses)

(cysE, serine acetyl transferase-encoding; sulfur-containing amino acids
 and manufacture by using microorganisms)

IT Gene, microbial

RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES
 (Uses)

(cysK, O-acetylserine lyase-encoding; sulfur-containing amino
 acids and manufacture by using microorganisms)

IT Gene, microbial

RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES
 (Uses)

(phosphotransacetylase-encoding gene pta; sulfur-containing amino acids and
 manufacture by using microorganisms)

IT Escherichia coli

(recombinant producer; sulfur-containing amino acids and manufacture by
 using

microorganisms)

IT Fermentation
(sulfur-containing amino acids and manufacture by using microorganisms)

IT Sulfides, reactions
RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)
(sulfur-containing amino acids and manufacture by using microorganisms)

IT Amino acids, preparation
RL: BPN (Biosynthetic preparation); BIOL (Biological study); PREP
(Preparation)
(sulfur-containing; sulfur-containing amino acids and manufacture by using
microorganisms)

IT Coliphage λ
(λ 501CYSxPTA (recombinant); **genes** cysE and
cysK and pta of *Escherichia coli* on; sulfur-containing
amino acids and manufacture by using microorganisms)

IT 56-45-1, L-Serine, reactions 72-89-9, Acetyl CoA 56858-93-6, Acetyl
phosphoric acid
RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)
(sulfur-containing amino acids and manufacture by using microorganisms)

=>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-9982

(43) 公開日 平成9年(1997)1月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/12			C 1 2 P 13/12	B C
C 1 2 N 1/21 // C 0 7 H 21/04 C 1 2 N 9/10	Z N A	7804-4B	C 1 2 N 1/21 C 0 7 H 21/04 C 1 2 N 9/10	Z N A B
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 20 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願平7-168931		(71) 出願人	591178012 財団法人地球環境産業技術研究機構 京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地
(22) 出願日	平成7年(1995)7月4日		(72) 発明者	畑本 修 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
			(72) 発明者	野口 薫 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
			(72) 発明者	松山 旭 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
			(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-含硫アミノ酸の製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 (A) L-セリンと、(B) 硫化物と、(C) アセチルCoAと、(D) アセチルリン酸と、(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【効果】 L-セリンからL-含硫アミノ酸を簡便に、しかも従来法と比較して、高収率で製造することができる。しかも、PTAとアセチルリン酸との存在下で反応を行うことから、大量のアセチルCoAを添加する必要がなく、L-含硫アミノ酸を安価に製造することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) L-セリンと、

(B) 硫化物と、

(C) アセチルCoAと、

(D) アセチルリン酸と、

(E) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

(F) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

(G) O-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【請求項2】 (A) L-セリンと、

(B) 硫化物と、

(C) アセチルCoAと、

(D) アセチルリン酸と、

(F') 少なくともホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

(H) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【請求項3】 (A) L-セリンと、

(B) 硫化物と、

(C) アセチルCoAと、

(D) アセチルリン酸と、

(E') 少なくともセリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

(I) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【請求項4】 (A) L-セリンと、

(B) 硫化物と、

(C) アセチルCoAと、

(D) アセチルリン酸と、

2

(G') 少なくともO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

(J) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) およびホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【請求項5】 (A) L-セリンと、

(B) 硫化物と、

(C) アセチルCoAと、

(D) アセチルリン酸と、

(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法。

【請求項6】 セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNA。

【請求項7】 セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) およびO-アセチルセリンリアーゼ (OASL) をそれぞれコードするDNAが大腸菌由来のものである請求項6に記載の組換え体DNA。

【請求項8】 請求項6または7に記載の組換え体DNAにて形質転換した微生物。

【請求項9】 微生物が大腸菌である、請求項8に記載の微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、組換え体DNAにて形質転換した微生物が産生する、セリンアセチルトランスフェラーゼ (以下、SATという。)、ホスホトランスアセチラーゼ (以下、PTAという。) およびO-アセチルセリンリアーゼ (以下、OASLという。) を利用したL-含硫アミノ酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 L-含硫アミノ酸、すなわちL-システインやL-シスチンは、化粧品、医薬品、食品添加物等として有用である。そのようなL-含硫アミノ酸の酵素的生産法の一つとして、SATおよびOASLの存在下、L-セリン、アセチルCoAおよび硫化物を反応させ、反応物中にL-含硫アミノ酸を生成させる方法が提

案されている(N.M.Kredich, G.M.Tomkins : J. Bacteriol., 241, 4955-4965(1966))。しかしながら、この反応では、高価なアセチルCoAを大量に必要とすること、SAT活性が生成したL-含硫アミノ酸により厳しいフィードバック阻害(feedback inhibition)を受けるため(D.Denk, A.Bock, : J. Gen. Microbiol., 133, 515-525 (1987))、L-含硫アミノ酸の生産量が極めて低いことなどの問題点を有している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、微生物が産生するSATおよびOASLを利用して、L-セリン、アセチルCoA、および硫化物を反応させてL-含硫アミノ酸を生成させる方法において、高価なアセチルCoAを大量に使用することなく、L-含硫アミノ酸を、簡便、高収率で、かつ安価に製造する方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究した結果、微生物が産生するSATおよびOASLを利用して、L-セリン、アセチルCoA、および硫化物を反応させてL-含硫アミノ酸を生成させる際に、PTAおよびアセチルリン酸の存在下で反応を行うと、L-セリンからL-含硫アミノ酸が合成されると同時に、消費されたアセチルCoAが再生されるので、大量のアセチルCoAを添加することなしに高収率でL-含硫アミノ酸を合成することができるとの知見を得た。本発明はその知見に基づいて完成されたものである。

【0005】すなわち、本発明は、(A) L-セリンと、(B) 硫化物と、(C) アセチルCoAと、(D) アセチルリン酸と、(E) セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、

【0006】(F) ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、(G) O-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

【0007】また、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(F')少なくともホスホトランスアセチラーゼ(PTA)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、(H) セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)およびO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組

込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

【0008】更に、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(E')少なくともセリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、(I) ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)およびO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

【0009】更に、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(G')少なくともO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物と、(J) セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)およびホスホトランスアセチラーゼ(PTA)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

【0010】更に、本発明は、上記(A)～(D)成分と、(K) セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)およびO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物とを反応させてL-含硫アミノ酸を生成させることを特徴とする、L-含硫アミノ酸の製造方法を提供する。

【0011】更に、本発明は、セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)およびO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAを提供する。更に、本発明は、セリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)、ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)およびO-アセチルセリンリアーゼ(OASL)をそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物を提供する。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。

(A)～(D)成分

本発明は、微生物の産生する酵素、すなわちSAT、PTAおよびOASLを利用して、(A) L-セリン、(B) 硫化物、(C) アセチルCoA、および(D) アセチルリン酸を反応させて、L-セリンからL-含硫アミノ酸を合

5

成するものである。消費されたアセチルC o Aの再生酵素であるPTAの存在下で反応させることから、原料として高価なアセチルC o Aの添加量を低く抑えることができ、(C)成分のアセチルC o Aの添加量はL-セリン1mmol当たり、通常、0.0005~1mmol、好ましくは0.001~0.5mmolである。

【0013】また、(B)成分の硫化物としては、例えば、硫化水素、硫化ナトリウム、硫化カリウム、水酸化ナトリウム等が挙げられる。硫化物の添加量は、L-セリン1mmol当たり、通常、0.1~1mmolである。(D)成分のアセチルリン酸の添加量は、L-セリン1mmol当たり、通常、0.05~2mmol、好ましくは0.1~0.6mmolである。

【0014】(E)~(K)、(E')、(F')および(G')成分(E)成分はSATをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(F)成分はPTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(G)成分はOASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、

【0015】(H)成分はSATおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(I)成分はPTAおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(J)成分はSATおよびPTAをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、

【0016】(K)成分はSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(E')成分は少なくともSATをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(F')成分は少なくともPTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、(G')成分は少なくともOASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにより、形質転換した微生物の菌体および/またはその処理物である。

【0017】尚、(E')成分は、具体的には、(E)成分、(H)成分、(J)成分および(K)成分から選ばれる。(F')成分は、具体的には、(F)成分、(I)成分、(J)成分および(K)成分から選ばれる。(G')成分は、具体的には、(G)成分、(H)成分、(I)成分および(K)成分から選ばれる。上記のSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードする遺伝子は、どのような微生物に由来するものでもよいが、特に、遺伝的、構造的に解明されている大腸菌由来のものが好適に用いられる。

【0018】また、本発明に用いるベクターDNAとしては、如何なるものでもよく、例えば、細菌の場合、プラスミドベクターDNA、バクテリオファージベクターDNAなどを挙げることができる。具体的には、例えば、プラスミドpBR322DNA〔セスダ・リサーチ・ラボ

6

ラトリーズ(Bethesda Research Laboratories)社製〕、プラスミドpUC118DNA(宝酒造社製)、ファージλc1857 1121(特開昭58-212781号公報)などが好適である。

【0019】PTA、SATおよびOASLをそれぞれコードする遺伝子、すなわちpta、cysEおよびcysKは、その構造、塩基配列も公知である(Z. Leishら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 892-898 (1993)

; A. Matsuyamaら, Biochim. Biophys. Acta, 1219, 559-562 (1994)を参照のこと)。pta遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出されるPTAのアミノ酸配列を図1~3に、cysE遺伝子およびcysK遺伝子の塩基配列をそれぞれ図4および図5に示す。それら遺伝子をベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物の調製法は、上記文献に記載された方法に準じるか、通常の公知の方法を用いて行うことができる。例えば、次のような方法および手順で調製される。

【0020】まず、目的遺伝子が調製される。これには、例えば、次のような方法が用いられる。

1) 化学的合成法: この方法は、目的遺伝子の構造、およびその塩基配列が分っている大腸菌の場合に好適に用いることができる。公知の塩基配列に従って化学的に全合成し、クローニング用ベクター中にクローニングする。

【0021】2) 公知の方法で、目的遺伝子のmRNAを調製し、それから目的のcDNAクローンを逆合成し、クローニング用ベクターにクローニングする。この方法は、かび、酵母などの真核生物に好適に用いられる。

3) 目的酵素を精製し、その酵素蛋白質の一部のアミノ酸配列を決定する。それに基づいて、目的遺伝子のオリゴDNAプライマーを化学合成する。そのプライマーを用いて、サザンブロッティング法により目的遺伝子を含むDNA断片混合物から目的遺伝子DNAを取り出す。それを鋳型として、PCR法により増幅させ、そのDNA断片をクローニング用ベクター中にクローニングする。そして、制限酵素により切断して目的遺伝子のDNA配列部分だけのものにする。前記DNA断片混合物は、染色体DNAの各種制限酵素による切断や物理的せん断などの公知方法で調製できる。この方法は原核生物について、好適に用いることができる。

【0022】4) 目的遺伝子の構造、塩基配列が分っている場合に好適に用いられる方法であるが、N末端、C末端の塩基配列の一部を化学合成し、それらをプライマーとして、PCR法により、目的遺伝子DNA断片を含む染色体DNA(遺伝子供給源となる微生物から抽出精製した染色体DNA)断片混合物中、若しくは目的遺伝子DNAを保持する染色体DNA(遺伝子供給源となる微生物から抽出精製した染色体DNA)において、目的

7

遺伝子だけを増幅させる。反応物をアガロース電気泳動し、増幅された目的遺伝子をゲル板から取り出し、クローニング用ベクターにクローニングする。この方法は、大腸菌の場合に好適に用いられる。

【0023】上記1)～4)の方法により調製された目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAを用いて、微生物、例えば前記エッシャーヒア属に属する大腸菌株を形質転換あるいは形質導入してそれぞれの菌株を得る。この形質転換はディー・エム・モリーソン(D.M. Morrison)の方法(Methods in Enzymology, 68, 326-331 (1979) 参照)により行なうことができる。また形質導入はビー・ホーン(B. Hohn)の方法(Methods in Enzymology, 68, 299-309 (1979) 参照)によって行なうことができる。

【0024】各目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAにて形質転換あるいは形質導入した各菌株について、各目的遺伝子が目的の酵素、すなわち、SAT、PTAおよび/またはOASLを生産しているかどうかを確認するために各酵素の活性を測定する。それによって、目的の遺伝子がクローニングされたかどうかを確認される。

【0025】また、最も一般的な方法であるが、目的遺伝子は、下記の方法によっても調製することができる。5) 目的遺伝子を含有する染色体DNAから公知の方法でDNA断片混合物を調製する。これらのDNA断片をアトランダムに公知の方法でクローニング用ベクターにクローニングする。

【0026】次いで、上記5)の方法により調製された目的遺伝子を組込んだ組換え体ベクターDNAを用いて、微生物、例えば前記エッシャーヒア属に属する大腸菌株を形質転換あるいは形質導入してそれぞれの菌株を得る。そして、上記菌株からSAT、PTAおよび/またはOASL生産性を有する菌株を公知の方法によりスクリーニングすることにより、各遺伝子を含有するDNAをベクターDNAに挿入した組換え体DNAを含み、SAT、PTAおよび/またはOASL生産性を有する大腸菌菌株を得ることができる。

【0027】上記のスクリーニングとしては、例えば、形質転換された大腸菌株あるいは形質導入された大腸菌株を適宜な寒天培地にまいて、コロニーを形成させる。コロニーを適宜なメンブランに移しとり、メンブラン上で菌体を溶菌する。前記コロニーが溶菌されたメンブラン上で、溶菌コロニーと各酵素の一部のアミノ酸配列から化学合成されたオリゴDNAを放射能標識するか、抗体を用いて酵素標識し、これらの標識化オリゴDNAとのハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションをしたコロニーを、適宜な培地に釣上げて、培養する。

【0028】スグリーニングにより得られた菌株から純化された新規な組換え体DNAを得る方法としては、例

8

えば、ビー・グーリー(P. Guerry)らの方法(J. Bacteriol., 116, 1064-1066 (1973) 参照)、デ・ビ・クレウエル(D.B. Clewett)の方法(J. Bacteriol., 110, 667-676 (1972) 参照)などが挙げられる。次いで、上記の純化された新規な組換え体DNAに、例えば、制限酵素Sma IおよびKpn I (いずれも宝酒造社製)を作用させて、DNA断片混合物を得る。上記DNA断片混合物より各種遺伝子を単離するには、ティ・マニアティス(T. Maniatis)らの方法(Molecular Cloning, 173-178 頁, 1982年, Cold Spring Harbor Laboratory 出版)により得ることができる。

【0029】上記のようにして単離された目的の遺伝子cysE、ptaおよびcysK、すなわち、SAT、PTAおよびOASLをコードするDNA配列に、公知の方法で、宿主細胞に応じた、公知の適宜なプロモーター、例えばラック(Lac)プロモーター、トリップ(Trp)プロモーター、あるいは制御配列などを連結する。勿論、cysE、pta、cysK自身のプロモーター、制御配列を好適に用いることができる。

【0030】更に、宿主細胞に応じた、公知のターミネーター配列、或いは終止コドンUAA、UAG、UGAを公知の方法で連結する。また、cysE、pta、cysK自身の終止コドン、ターミネーター配列も好適に用いることができる。このようにして、SAT、OASLおよび/またはPTAを生産する組換え体DNAを調製することができる。

【0031】なお、発現用ベクター自体に含有されるプロモーター、ターミネーターなどを好適に用いることもできる。得られたプロモーター等を連結したDNAをクローニング用ベクターに挿入しない連結する。次いで、このクローニング用ベクターに組み込まれた目的遺伝子DNA断片を、適宜な制限酵素で該ベクターより切り出して、公知の通常発現用ベクターに挿入しない連結して、組換え体発現ベクターが調製される。公知の発現ベクターとしては、すなわち、プラスミドベクターとしては、例えば、pBR322、ファージベクターとしては、例えば、λcl857 1121 (特開昭58-212781号公報)など挙げることができる。

【0032】この場合、ベクターにSAT、PTAおよびOASLから選ばれる1種の酵素をコードするDNAを組込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできる。また、同一ベクターにSAT、PTAおよびOASLから選ばれる2種をそれぞれコードするDNA2種を組込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできるし、同一ベクターにSAT、PTAおよびOASLをそれぞれコードするDNA3種を組込んだ組換え体発現ベクターを調製することもできる。これは、前記D. Leishらの方法、松山らの方法(特開平1-228473号公報)により達成できる。例えば、遺伝子DNA或いはプロモーターDNA領域の両外側に新たに制限酵素切断部位を作製

することにより、同一ベクターに2種以上の遺伝子DNAをそれぞれ1個以上挿入することができる。

【0033】また、SATは、合成されたL-含硫アミノ酸によりフィードバック阻害を受けるので、L-含硫アミノ酸によるフィードバック阻害を受けないようにSATをコードする遺伝子cysEを処理することが、本発明においては極めて好適である。それには、Mutant⁺-K (宝酒造社製) キットなどが一般的に用いられる。具体的にはD. Denkらの方法(J. Gen. Microbiol., 133, 515-525 (1987)) に従って、一塩基置換などを行えばよい。また、亜硝酸、ギ酸、ヒドラジン等の処理すること〔新基礎生化学実験講座7、遺伝子工学、丸善(株)出版、90頁、1988年〕、微生物自体のSAT活性がこのような阻害を受けにくくなった変異株より取り出した遺伝子cysEを用いることなどによっても好適に達成できる。

【0034】前記のようにして調製された、目的遺伝子を組込んだ組換え体発現ベクターを用いて、各種微生物を形質転換あるいは形質導入して形質転換体を得る。この場合、前記の目的遺伝子クローニングに用いた形質転換法あるいは形質導入法をそのまま用いることができる。なお、遺伝子の供給源となる微生物からの染色体DNAの抽出は、通常の公知の方法で行うことができる。目的酵素の活性を有する微生物の培養菌体をリゾチームおよび界面活性剤で処理して、溶菌する。これについて、除蛋白処理を施す。次いで、エタノールで沈殿させる斎藤、三浦の方法(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) により単離できる。

【0035】上記の組換え体DNAにより形質転換される宿主は特に限定されないが、よく用いられるものとして、例えば、エッシャーヒア属に属する大腸菌を挙げることができる。具体的には、大腸菌K-12、好ましくは、HB101 (ATCC33694)、DH1 (ATCC33489)、x-1776 (ATCC31244)、1100 [Max-Plank-Institut (ハイデルベルグ) より入手]、JM101 (ATCC3876)等を挙げることができる。

【0036】本発明で用いる形質転換された微生物は、前記したように、SAT、PTAおよびOASLの中の少なくとも一つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものであればよいが、使用する微生物の種類を減らすことができるという観点から、上記酵素の中の二つ以上の酵素をそれぞれコードするDNAが組み込まれたものを使用するのが好ましく、更に上記三つの酵素をそれぞれコードするDNAが組み込まれたものを使用するのが好ましい。尚、一つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは、(E)、(F) および(G) 成分であり、二つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは、(H)、(I) および(J) 成分であり、三つの酵素をコードするDNAが組み込まれたものは(K) 成分である。

【0037】上記のSAT、PTAおよび/またはOA

SL生産性を有する微生物の培養は、通常の微生物の培養に通常用いられる合成ないし天然培地を用いて行なうことができる。そして、その成分は、例えば、次のようなものを用いられる。

(1) 炭素源: ブドウ糖、果糖、蔗糖、マルトース、粗糖類、糖蜜類(例えば、甜菜糖蜜、甘藷糖蜜)、各種澱粉類(例えば、タピオカ、サゴヤシ、甘藷、馬鈴薯、トウモロコシ)またはその酸糖化液類、酵素糖化液類。

【0038】(2) 窒素源: ペプトン、大豆粉、コーンステイープリカー、酵母エキス、肉エキス、大豆そのものまたは脱脂大豆またはそれらの粉体または粒体またはそれらの抽出液、尿素などの有機窒素源類、また硫酸、硝酸、塩酸、炭酸などのアンモニウム塩類、アンモニアガス、アンモニア水などの無機窒素源類。

(3) その他: 菌の生育に必要な各種無機塩類、例えば、カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛などの硫酸塩類、塩酸塩類、リン酸塩類、酢酸塩類。また、アミノ酸類、ビタミン類。アミノ酸類としては、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジンなど、ビタミン類としてはビオチン、サイアミンなどを挙げることができる。

【0039】これらの成分もしくは素材が適当に選択され、単独または組合せて、かつSAT、PTAおよびOASLの生産ができるように、それらを含有せしめて、無機もしくは有機合成培地または天然培地の液体培地が製造される。その際、培地のpHは、5~9、好ましくは6~8に苛性ソーダ、苛性カリ、アンモニアなどで調整される。培地の殺菌は、通常の方法、例えば、110~140℃で8~15分間加熱して行なえばよい。

【0040】培養は、振とう培養、通気攪拌培養などの好気的条件下で行なう。培養温度は25~45℃、好ましくは30~40℃が適当である。培養時のpHは5~9、好ましくは6~8が適当である。pHの調節は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、またはそれらの水溶液によって行なう。培養期間は通常2~7日間である。

【0041】このようにして得られた培養物あるいは培養物から遠心分離、または限外濾過、若しくは通常の濾過など操作により得られた生菌体、その乾燥菌体、生菌体を自己消化、各種磨砕あるいは各種音波処理などを施すことにより得られる菌体処理物、およびこれらの菌体の抽出物より得られる酵素含有物が、SAT、PTAおよびOASLの酵素源として用いられる。また、上記菌体もしくは酵素含有物を固定化した菌体処理物なども好適な酵素源として用いることができる。

【0042】尚、上記菌体の処理物からSAT、OASL、PTAを分離精製することも可能である。これらの酵素を分離精製するには、通常のこれら酵素の分離精製法が適用される(酵素ハンドブック、238頁、246頁、

710 頁；朝倉書店出版、1982年；丸尾文治、田宮信雄監修）。すなわち、プロタミン処理、エタノール分画、硫酸分画、カルシウムアバタイト処理もしくはそれによるクロマトグラフィー、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、DEAE-セハデックスクロマトグラフィー、QAE-セルロースクロマトグラフィー、QAE-セハデックスクロマトグラフィー、セハデックスG-200、100、もしくは50などまたはセファロース6Bによるゲル濾過クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲルなどを用いる電気泳動、各種充填材によるHPLCなど、またはそれらの適宜な組合せにより分離精製される。

【0043】また、上記のように組換え体DNAにより形質転換した微生物は、SAT、OASLおよび／またはPTA生産能が高い、即ち、菌体蛋白質1mgあたりのSAT、OASLおよび／またはPTA活性が高いことから、上記のように微生物菌体から酵素を分離精製することなく、菌体または磨砕、破壊などの処理物をそのまま酵素源として用いることができる。具体的には、SATをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のSAT活性は、菌体蛋白質1mg当たり0.1～30Uである。また、OASLをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のOASLの活性は菌体蛋白質1mg当たり2～300Uである。更に、PTAをコードするDNAをベクターDNAに組込んだ組換え体DNAにて形質転換した微生物のPTAの活性は菌体蛋白質1mg当たり5～300Uである。

【0044】尚、SAT活性が0.1U/mg未満の場合は、菌体自体のL-含硫アミノ酸の分解系の酵素活性が強くなるために、菌体および／またはその処理物をそのまま酵素源として用いることはできない。OASL活性が2U/mg未満、PTA活性が5U/mg未満の場合も同様である。またSAT活性が30U/mgを超える微生物菌体を調製することは現在むずかしい。OASLが300U/mgを超える場合、PTA活性が300U/mgを超える場合も同様である。

【0045】L-含硫アミノ酸の製造法

(A)～(D)成分と、(E)～(G)成分とを反応させるか、(A)～(D)成分と、(F')成分および(H)成分とを反応させるか、(A)～(D)成分と、(E')成分および(I)成分とを反応させるか、(A)～(D)成分と、(G')成分および(J)成分とを反応させるか、(A)～(D)成分と、(K)成分とを反応させることにより、L-含硫アミノ酸を生成させることができる。

【0046】この場合、反応は適宜な緩衝液中で行うが、(A)～(D)成分は予め緩衝液に混合した後に、微生物の菌体および／またはその処理物と混合するのが好ましい。上記の混合において、混合する各種成分の濃度には特に制限はないが、一般的には、(A)成分のL-セリ

ンは50～150mM、好ましくは60～130mM、(B)成分の硫化物は10～50mM、好ましくは20～32mM、(C)成分のアセチルCoAは0.1～1mM、好ましくは0.3～0.5mM、(D)成分のアセチルリン酸5～30mM、好ましくは10～30mMである。

【0047】微生物の菌体および／またはその処理物の添加量は菌体の処理方法により異なるが特に制限がなく、基質の濃度、前記三つの酵素の活性、その他の種々の条件により適宜変更できる。この反応の場合、反応液中のSATの活性を、0.01～30U（以下Uは国際単位とする）、好ましくは0.03～30U、特に好ましくは0.1～30U、OASLの活性を1～300U、好ましくは3～300U、特に好ましくは5～300U、PTAの活性を0.5～300U、好ましくは1～300U、特に好ましくは5～300Uになるように微生物の菌体および／またはその処理物を反応液に存在させることが、L-含硫アミノ酸の反応率を上げるのによい。すなわち、アセチルCoA再生系を強化することにより、高価な原料であるアセチルCoAを低濃度にして、L-含硫アミノ酸の反応率を上げることができる。

【0048】この場合、反応液中のSAT活性が0.01U未満の場合は、該活性が反応生成物であるL-含硫アミノ酸による阻害すなわちフィードバック阻害を受けるようになり、L-含硫アミノ酸の反応率が低下する。OASL活性が1U未満の場合は、O-アセチル-L-セリンが反応液中に生成蓄積するがL-含硫アミノ酸の生成蓄積量はすくなくなる。PTA活性が0.5U未満の場合は、アセチルCoAの生成量が少なくなると、上記原料の他にアセチルCoAを多量添加しないと反応が円滑に進行しなくなる。また、SAT活性が30Uを超える場合は、反応に必要とする以上の量であるので、L-含硫アミノ酸の生産コストが上昇するので、好ましくない。OASL活性が300Uを超える場合、PTA活性が300Uを超える場合も同様である。

【0049】本発明の方法において、生菌体、または乾燥菌体自体を酵素源として用いる場合、各種界面活性剤または各種有機溶剤を反応液に添加することにより、より収率よく生成物を得ることができる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウムブロマイドなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸などのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート（例えば、ノニオンST221、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤などL-含硫アミノ酸の生成を促進するものならば、いずれでも使用できる。これらは通常、反応液1ml当たり1～50mg、好ましくは1～20mgの濃度で用いられる。

【0050】有機溶剤としては、トルエン、キシレン、アセトン、脂肪族アルコール、ベンゼンあるいは酢酸エ

13

チルなどを用いることができる。これらは、通常、反応液1ml当たり、0.1~50 μ l、好ましくは1~20 μ lの濃度で用いられる。反応温度は、通常10~60℃、好ましくは20~50℃、特に好ましくは36~48℃であり、pHは通常5~9、好ましくは6~8.5である。また、反応は、通常、1~80時間で完了する。

【0051】反応液からのL-含硫アミノ酸、すなわちL-システインおよび/またはL-シスチンの分離精製は、通常の酵素反応液、発酵液からのアミノ酸の精製に用いられる方法を用いて行なうことができる。たとえば、反応終了後に反応液に通気を行なえば、L-システインは酸化されてL-シスチンとなって沈殿するので容易に単離できる。このようにして得られるL-シスチンは電気分解などによる還元により容易にL-システインとなる。

【0052】

【実施例】以下本発明を実施例をもって説明する。本発明においては、L-含硫アミノ酸、すなわちL-システインおよびL-シスチンの定量法、SAT、OASL、PTAの活性測定法は以下のとおりである。

【0053】〔L-含硫アミノ酸の定量法〕L-システインおよびL-シスチンを、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で定量した。本発明ではL-システインとL-シスチンの合計量を本発明の酵素反応により生成したL-含硫アミノ酸量とした。

【0054】HPLCによる定量は、NBD-F（7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole）を用いたHPLC-蛍光法（Y. Watanabe, K. Imai, J. Chromatogr., 239, 723 (1982)）をもとに行なった。反応液を40倍に希釈し、その100 μ lを10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）700 μ lに加えた。これに10mMNBD-Fのアセトニトリル溶液100 μ lを加え、遮光下60℃で4分間加熱することによってアミノ酸を蛍光ラベル化した。30秒間氷冷し、1N塩酸を100 μ l加えて反応を停止した。生成物20 μ lをHPLCカラムに注入し、下記条件にて分析を行った。即ち、カラムはWaters社製 μ BONDAPAK C18 125A10 μ m（3.9 \times 150mm）を室温で用い、溶出液A（50mM 酢酸アンモニウム-アセトニトリル-メタノール（80:10:10, v/v））を5.5分、次に溶出液B（50mM 酢酸アンモニウム-アセトニトリル-メタノール（30:30:40, v/v））を流速0.8ml/minで用いた。検出は蛍光検出器（HITACHI F-1000 Fluoro photometer）を用いて λ_{ext} 470nm、 λ_{em} 540nmで行った。この条件下での保持時間はシステイン19分、シスチン22分であり、各アミノ酸は標準品から得た検量線より算出した。

【0055】〔SAT活性〕

試薬1：10mM トリス塩酸（pH7.6）（1mM Na₂EDTA含有）、1mM L-セリン、および0.1mM アセチルCoAを含有する。試験管（1 \times 8cm

14

m）に試薬1を1.95mlとり、適宜に希釈した酵素液を0.05ml加えて、1分間当りの232nmでの吸光度の減少（アセチルCoAの消費量）を測定する。次式により酵素活性を算出する。

$(\Delta OD / 4.2) \times 40 = \text{酵素液1ml当りの活性 (U/ml)}$

【0056】〔OASL活性〕

試薬2：160mM トリス塩酸、100mM O-アセチル-L-セリン、3.2mM 硫化ナトリウム、0.8mM EDTAおよび0.2mM ビリドキサールリン酸を含む溶液（pH7.2~7.3）

試薬3：1mM 亜硝酸溶液（0.1M NaNO₂/0.4N H₂SO₄、1v/99v）

【0057】試薬4：2%スルファミン酸ナトリウム溶液

試薬5：塩化水銀溶液（下記のA、B、C溶液を1:4:2（v/v）の割合で混合した）

A：2%塩化水銀溶液（0.4N 塩酸で調製）

B：6.88%スルファミン酸アミド溶液（0.4N 塩酸で調製）

C：0.2%N-1-ナフチル-エチレンジアミン無水塩酸塩溶液（0.4N 塩酸で調製）

【0058】試験管（1 \times 8cm）に試薬2を190 μ lとり、次に適宜に希釈した酵素液10 μ l加えて4分間酵素反応を行う。試薬3を1ml加えて反応を停止させ、6分後、試薬4を0.1ml加え、2分間攪拌する。試薬5を1.6ml加え、6~10分後、発色した色を540nmで比色定量する。次式に活性を算出する。

$(\Delta OD / 4 / 0.27 / 10) \times 20 \times \text{希釈率} = \text{酵素液1ml当りの活性 (U/ml)}$

【0059】〔PTA活性〕

試薬6：100mM トリス塩酸（pH8.0）、5mM 塩化マグネシウム、0.5mM NAD、0.5mM CoA、5mM L-リンゴ酸、12.5 μ g/ml リンゴ酸脱水素酵素、25 μ g/ml クエン酸合成酵素（citrate synthase）。

【0060】試薬7：100mM アセチルリン酸溶液。

試験管（1 \times 8cm）に試薬6を2.7mlとり、適宜に希釈した酵素液0.1mlを加え、次に試薬7を0.2ml加えて30℃にて2分間酵素反応を行なう。その間の340nmの吸光度の増加（NADHの生成量=アセチルCoAの生成量）を測定する。次式により酵素活性を算出した。

$(\Delta OD / 2 / 6.220) \times 30 \times \text{希釈率} = \text{酵素液1ml当りの活性 (U/ml)}$

【0061】〔実施例1〕-組換え体微生物の作製-

（1）大腸菌1100株の染色体DNAの調製

大腸菌（Escherichia coli）1100株（Max-Plank-Institut（ハイデルベルグ；ドイツ）より入手）をT-Y培

15

地(1% (w/v) トリプトン(Difco 社製)、0.5% 酵母エキス(Difco 社製)、および0.5% (w/v) NaCl、pH 7.2) 100mlに接種し、温度37℃で8時間振盪培養し、培養物を得た。

【0062】この培養物を、10,000rpmで15分間、常法により遠心分離処理し、湿潤菌体0.5gを得たのち、該菌体から斎藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963))により染色体DNAを得た。次いで、この染色体DNA 60μgおよび制限酵素Sau3AI(東洋紡績社製)3Uを、10mMトリス塩酸緩衝液(50mM NaCl、10mM MgSO₄および1mM ジチオスレイトール含有、pH 7.4)に各々混合し、温度37℃で30分間反応させた。反応終了後、該液を常法により、フェノール抽出処理したのち、エタノール沈殿処理し、このSau3AIで消化されたDNA断片が再結合することを防止するために、アルカリフォスファターゼ処理(Molecular Cloning、133-134頁)し、DNA断片末端の脱リン酸化を行なった。更に常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈殿処理して、Sau3AIで消化された大腸菌1100株の染色体DNA断片50μgを得た。

【0063】ptaの単離

(2) 組換え体プラスミドpPT100DNAの作製

プラスミドpBR322DNA(Bethesda Research Laboratories社製)10μgおよび制限酵素BamHI(宝酒造社製)100Uを50mMトリス-HCl緩衝液(100mM NaCl、10mM MgSO₄含有、pH 7.4)に混合し、温度37℃で2時間反応させて消化液を得た後、該液を常法によりフェノール抽出およびエタノール沈殿処理して、BamHIで消化されたプラスミドpBR322DNAを得た。

【0064】次いで、このBamHIで消化されたプラスミドpBR322DNA 10μg、項(1)で得られたSau3AIで消化された大腸菌1100株の染色体DNA断片10μgおよび5UのT4DNAリガーゼ(Boehringer Mannheim社製)を6.6mM MgCl₂、10mMジチオスレイトールおよび10mM ATPを含有する6.6mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に添加し、温度16℃で16時間反応させ、DNAを連結させ、種々の組換え体プラスミドDNAを得た。

【0065】そして、ディ・エム・モーリソン(D. M. Morrison)の方法(Methods in Enzymology, 68, 326-331 (1979))により、塩化カルシウム処理した大腸菌1100株を、上記のように連結させた種々の組換え体プラスミドDNAで形質転換し、アンピシリン耐性およびテトラサイクリン感受性の形質転換株3000株を得た。このようにして得られた形質転換株のPTA活性を前記のようにして測定し、宿主大腸菌1100株よりPTA活性が上昇している形質転換株である大腸菌1100(pPT100)株を得た。

【0066】(3) 組換え体プラスミドpPT100 DNA

16

の単離

前記大腸菌1100(pPT100)株からT. Maniatisらの方法(Molecular cloning、86-96頁、1982年; Cold Spring Harbor Laboratory 出版)により、組換え体プラスミドpPT100を単離精製した。すなわち、前記T-Y培地で、37℃、24時間前培養して得た大腸菌1100(pPT100)株の培養液20mlを、該培地11に接種し、37℃で3時間振盪培養したのち、培養液にクロラムフェニコール0.2g添加し、更に同一温度で20時間培養し、培養液を得た。

【0067】次いで、この培養液を、常法により10,000rpmで10分間遠心分離処理して湿潤菌体を得た。これを20mlの25% (w/v) ショ糖を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁したのち、さらに、これに、リゾチーム10mg、0.25M EDTA溶液(pH 8.0)8mlおよび20% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液8mlを夫々添加し、60℃で30分間、保温して溶菌し、溶菌液を得た。

【0068】この溶菌液に、5M NaCl溶液13mlを添加し、4℃で16時間処理したものを常法により15,000rpmで30分間遠心分離して抽出液を得た。これを常法によりフェノール抽出したのち、常法によりエタノール沈殿処理し、沈殿物を得た。そして、この沈殿物を、常法により減圧乾燥処理したものを、1mM EDTAを含有する10mMトリス塩酸緩衝液6ml(pH 7.5)に溶解し、更に、これに塩化セシウム6gおよび10mg/mlエチジウムブロマイド0.2mlを添加したものを、常法により39,000rpmで42時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心処理を行なった。該処理物から組換え体プラスミドpPT100DNAを単離し、また、更に、n-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除いたのち、1mM EDTA含有の10mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に対して透析を行ない純化された組換え体プラスミドpPT100DNA(10.0kb)1mgを得た。

【0069】(4) 新規な組換え体プラスミドpAK222LLの作製

大腸菌の遺伝子ptaは、リンケージ・マップ(Microbiological Reviews 第47巻、第2号、180~230頁(1983年))上、アセテートカイネース遺伝子のすぐ下流に位置づけられている。上記(3)で得られたpPT100DNAと、アセテートカイネース遺伝子を含むpAK122DNA(FERM BP-1534)の制限酵素地図を比較した結果、KpnIとBamHIの間がオーバーラップしていることが明らかとなった。そこで、pAK122DNA上のアセテートカイネース遺伝子上流にあるプロモーター領域を利用して遺伝子ptaの発現が可能なプラスミドDNAを以下の通り作製した。

【0070】組換え体プラスミドpAK122DNA(FERM BP-1534) 0.2μg並びに制限酵素BamHI、HindIII(とも

17

に、宝酒造社製)で切断し、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿処理して、BamHI、HindIIIで消化されたプラスミドpAK122DNAを得た。次いで、項(3)で得られた組換え体プラスミドpPT100DNA 1 μ gをBamHI、HindIIIで反応させて得た消化液を0.7%アガロースゲル電気泳動したのち、ゲルより1.6kbのDNA断片をR. C. A. Yangらの方法(Methods in Enzymology, 68巻, 176~182頁, 1971年)により目的のDNAを溶出した。溶出物をフェノール抽出処理、エタノール沈殿処理をして目的の精製されたDNA断片0.3 μ gを得た。

【0071】上記のようにして得た0.3 μ gのBamHI、HindIIIで消化したプラスミドpAK122DNA及びBamHI、HindIIIで消化した0.3 μ gのpPT100プラスミドDNA由来の1.6kbのDNA断片を、各々7 μ lの水に溶解し、これに混液(77mM トリス塩酸(pH7.4)/15mM MgCl₂/15mM ジチオスレイトール/0.15mM ATP)13 μ l及び1 UのT4DNAリガーゼを添加し、8℃で18時間連結反応を行った。この反応液を用いて、Journal of Bacteriology (19巻, 1072~1074頁)記載の形質転換法により、大腸菌JM101(ATCC33876)株を形質転換した。得られた形質転換株の含有するプラスミドDNAの制限酵素切断パターンを検討し、目的の組換えプラスミドDNAを得て、pAK22と命名した。

【0072】次に、pAK22上のpta遺伝子の両外側にEcoRI切断部位をつけるために、

5'CGCGAATTCGAAGCTTCTAGAG3'

5'CGCGTCTAGAGCTTCTGAATT3'

の配列からなるオリゴヌクレオチドを合成し、MluI *

5'ACATTAGATCCCATCCCATACTCAAATGTATGGTTAATACCGTTGAAATGCTGGTCTAT3'

の配列からなるオリゴヌクレオチドを、アプライバイオシステムズ社製 Model392 DNA/RNA シンセサイザーを用いて、常法により合成した。精製は、アプライバイオシステムズ社製オリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて常法により行った。

【0075】これら合成オリゴヌクレオチドをプライマーDNAとして用い、in vitroのDNA増幅によりcysE遺伝子を単離した。具体的には、Perkin-Elmer Cetus Instruments社製のDNA Thermal Cycler、及び宝酒造社製GeneAmp DNA Amplification Reagen Kitを用い、下記の条件で反応を行った。即ち、項(1)で作製した大腸菌1100染色体DNA溶液20 μ l (0.8 μ g/20 μ l TEバッファー)に、2N NaOH 10 μ l および滅菌水70 μ lを加え、70℃で、10分間加熱処理した。さらに、7.5M 酢酸アンモニウム50 μ l および冷エタノール450 μ lを加え、-80℃で30分間放置した後遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、吸引乾固し滅菌水20 μ lに溶解した。こうして得られたDNA溶液をテンプレートDNA溶液として用いた。反応は、反応バッファー10 μ l、dNTP混合物 ※50

18

*で切断したpAK222DNAと混合し、T4DNA ligaseで連結し、常法に従い大腸菌JM101を形質転換した。得られた形質転換株の含有するプラスミドDNAの制限酵素切断パターンを検討した結果、上記オリゴヌクレオチドが挿入された目的のプラスミドDNAを得て、pAK222Lと命名した。

【0073】引き続き、

5'ACTAGTCTCGAGAATTCTAGAGC3'

5'TCTAGAATTCTCGAGACTAGTC3'

10 の配列からなるオリゴヌクレオチドを合成し、Ksp I (ペーリンガー・マンハイム社製)で切断したpAK222L DNAと混合し、常法に従いT4DNA ligaseを作用させて連結後、大腸菌JM101を形質転換した。得られた形質転換株の含有するプラスミドDNAの制限酵素切断パターンを検討し、上記オリゴヌクレオチドが挿入された目的のプラスミドDNAを得た。これをpAK222LLと命名した。また、このプラスミドでの大腸菌形質転換体をJM101(pAK222LL)と命名した。尚、図6に、項(1)~

(4)に記載のpAK222LL作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0074】cysEの単離

(5)野生型大腸菌より遺伝子の単離、及び組換え体プラスミドの作製

遺伝子cysEは前記D. Denkらによって報告(D. Denk, A. Bock: J. Gen. Microbiol., 133, 515-525 (1987))された遺伝子塩基配列をもとにPCR法を用いて単離された。まず、N末端側に相当する

5'ATGTCGTGTGAAGAACTGGAAG3'

と、C末端側に相当する

※16 μ l、Taq polymerase 0.5 μ lにN末端側プライマーDNA 5 μ l、C末端側プライマーDNA 5 μ l、テンプレートDNA 0.2 μ l、滅菌水を加え全量を100 μ lとし、下記の反応温度条件で行った。

【0076】即ち、94℃3分、55℃1分30秒および72℃2分30秒の反応を1サイクル行い、次に94℃1分30秒、55℃2分および72℃2分の反応を25サイクル行った。最後に72℃で7分間放置した後、40分かけて4℃に下げた。反応終了後、増幅された約1kbのフラグメントをアガロース電気泳動により常法により単離精製し、T4 DNA polymeraseを作用させて末端を平滑化した。

【0077】プラスミドベクターpBR322DNA (宝酒造社製)をEcoRI及びNruIで消化後、DNA blunting Kit (宝酒造社製)で平滑末端とした。次に、常法に従ってアガロースゲル電気泳動をおこない、GENECLEAN II KIT (フナコシ(株)製)により複製起点を含む約3.4kbのDNA断片を取得した。得られたDNAをT4DNA ligaseにより環状にした後、EcoRIで切断し、直鎖にした。

【0078】次いで、以下に示すような大腸菌ラクトー

19

スオベロン等に由来するプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位及びターミネーター等の発現調節領域並びにHpaI切断部位及びマルチクロニングサイトを含むDNA配列をDNA Synthesizer Model 392 (アプライド*

AATTCGGTACCGGATCCGCTAGCTTTACATTATGCTCCGGCTCGTATAATGTGATGGAATTGTGAGCGG
GCCATGGCCTAGGCGATCGAAATGTAATACGAAGGCCGAGCATATTACACTACCTTAACACTCGCC

ATAACAATTCCATCGTTAGGAGGTTTGTAGTTAACTAACTAGTAGATCTGGTACCG
TATTGTTAAGGTAGCAATCCTCCAAAATCAATTGATTGTATCATCTAGACCATGGCTTAA

【0079】上記で平滑化した1kbのDNA断片をpUTE100のHpaI siteに導入し、pOHE100を得た。大腸菌株JM101を該形質転換プラスミドを用いて、前記同様に形質転換して形質転換株JM101(pOHE100)を得た。

【0080】(6) システインによるフィードバック阻害解除型 *cysE* の作製、及び組換え大腸菌の作製
さらに、*cysE* におけるMet256をIle256に変換するために、Kunkel法(Proc. Natl. Acad. Sci., 82巻、488頁、1985年)に基づく部位特異的変異処理(site-directed mutagenesis)を行った。具体的には、Met256の領域を含むオリゴヌクレオチド(5'-AATGCTGGTCAATATCCATTG-3')を常法により合成し、T4polynucleotide kinaseによるリン酸化を行った。次に、pOHE100とリン酸化オリゴヌクレオチドのアニールング、T4 DNAポリメラーゼ、T4 DNAリガーゼを用いてのリペアー反応を行った後、このプラスミドDNAを用いて大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを回収し、それにコードされている*cysE* 遺伝子の塩基配列を確認したところ、Met256を示すATGがIle256を示すATTに正しく変換されていることが明らかになった。

【0081】こうして得られた変異型*cysE* 遺伝子を含むプラスミドをpOHE100Tとした。そしてこのプラスミドで、前記ptaの単離に記した方法により大腸菌JM101を形質転換し、形質転換大腸菌株JM101(pOHE100T)を得た。更に、前記同様の調製法で、この形質転換体を用いて、組換え体プラスミドpOHE100T DNA 1mgを得た。尚、図7に、項(5)~(6)に記載のpOHE100T作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0082】*cysK* の単離

(7) 野生型大腸菌より遺伝子の単離、及び組換え体プラスミドの作製

前記D. Denkらによって報告された遺伝子塩基配列をもとにPCR法を用いて、*cysK* 遺伝子を単離した。まず、N末端側に相当する

5' ATGAGTAAGATTTTGAAGA3'

とC末端側に相当する

5' CAAGCTGGCATTACTGTTGC3'

の配列からなるオリゴヌクレオチドを、アプライトバイオシステムズ社製 Model392 DNA/RNAシンセサイザーを用いて、常法により合成した。精製は、アプライトバイ※50

20

*バイオシステムズ社製)をもちいて合成し、上記で得られたEcoRI断片と連結して発現ベクターpUTE100を作製した。

10※オシシステムズ社製オリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて常法により行った。これら合成オリゴヌクレオチドをプライマーDNAとして用い、invitro DNA増幅により*cysK* 遺伝子を単離した。具体的には、Perkin-ElmerCetus Instruments社製のDNA Thermal Cycler、及び宝酒造(株)製のGeneAmpDNA Amplification Reagent Kitを用い、下記の条件で反応を行った。

【0083】即ち、前記大腸菌1100染色体DNA溶液20μl (0.8μg/20μl TEバッファー)に、2N NaOH 10μl、滅菌水70μlを加え、70℃、10分間加熱処理した。さらに、7.5M酢酸アンモニウム50μl、冷エタノール450μlを加え、-80℃で30分間放置した後、遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、吸引乾固し滅菌水20μlに溶解した。こうして得られたDNA溶液をテンプレートDNA溶液として用いた。反応は、反応バッファー10μl、dNTPmix16μl、Taq polymerase0.5μlにN末端側DNA5μl、C末端側DNA5μl、テンプレートDNA0.2μl、滅菌水を加え全量を100μlとし、下記の反応温度条件で行った。即ち、STEP 1 (94℃ 3分、55℃ 1分30秒、72℃ 2分30秒)を1サイクル行い、次にSTEP 2 (94℃ 1分30秒、55℃ 2分、72℃ 2分)を25サイクル行った。最後にSTEP 3 (72℃ 7分、40分かけて 4℃におとす)を行った。

【0084】反応終了後、アガロース電気泳動により約1kbのフラグメントを常法により単離精製し、T4 DNA polymeraseを作用させて末端を平滑化し、pUTE100のHpaI siteに導入した。該プラスミドDNAをpOHK100と命名した。このようにして得られたプラスミドを用い、前記した方法により大腸菌JM101を形質転換し、形質転換体大腸菌株JM101(pOHK100)を得た。更に、前記同様に、この形質転換体を用いて、pOHK100 DNA 1mgを得た。尚、図8に、項(7)に記載のpOHK100 作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0085】同一ベクターに*cysE* および*cysK* 遺伝子を含む組換え体プラスミドDNAの調製

(8) 組換え体プラスミドpOHC100Tの調製

項(7)で作製した、lac-promoterより発現可能な*cysK* を保持するpOHK100をSpeI切断部位で切断した。次に、項(6)で作製したpOHE100TをSpeI、NheIで切断し、lac-promoterと変異型*cysE* を含む断片を、pOHK100のSpeI部位に導入した。その結果、変異型*cysE*

21

E. cys K (共にlac-promoterの支配下にある)の外側にEcoRI、KpnI切断部位を共に保持するpOHC100Tを得た。そして、このプラスミドを用いて、前記の方法により大腸菌JM101を形質転換し、形質転換大腸菌株JM101(pOHC100T)を得た。更に組換え体プラスミドpOHC100TDNA 1mgを前記同様にして調製した。

【0086】(遺伝子ptaを含有する組換え体ファージDNAの調製)

(9) バクテリオファージλcl857 1121の調製
特開昭58-212781号公報記載の実施例と全く同様にしてバクテリオファージλcl857 1121〔このファージは、このファージを常法により前記記載の大腸菌1100に溶原化して得られる溶原菌、すなわち、E. coli 1100(λcl857 1121)「微工研条寄第133号(FERM BP-133)」として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。〕を調製し、このバクテリオファージλcl857 1121から、T. Maniatisらの方法(Molecular Cloning、76~85頁、1982年; ColdSpring Harbor Laboratory 出版)によりバクテリオファージλcl857 1121のDNAを得た。

【0087】(10) バクテリオファージλcl857 1121Sの調製

次いで、このようにして得られたバクテリオファージλcl857 1121のDNA 2.1μg及び10ユニットのEcoRI(宝酒造社製)を50mMトリス-HCl緩衝液(100mM NaClおよび10mM MgSO₄含有、pH7.4)中で37℃で1時間反応させた、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿を行いバクテリオファージλcl857 1121のEcoRI消化物を得た。

【0088】このDNA断片0.4μgを、λcl857 Sam7 DNA(米国ワシントン社より入手)に添加した後、T4 DNAリガーゼ1ユニットを添加し、7℃で48時間保持して、組換え体DNAの混合物を得、更に該DNA混合物を、イン・ビトロ・パッケージング(in vitro packaging)法(Methods in Enzymology、68巻、281~298頁、1979年; Academic Press出版)によりバクテリオファージの被膜蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を得た。

【0089】次いで、この様にして得たバクテリオファージ粒子を大腸菌QD5003(九州大学より入手、以下、同株使用)を指示菌としてトリプトン寒天培地上に巻き、37℃で16時間培養した後、生じたプラークを観察した。これより、大腸菌1100を指示菌として用いた場合はプラークを形成せず、大腸菌QD5003を指示菌として用いた場合はプラークを形成する性質を有し、且つ後期プロモーターP'r部位より下流域で、その付着末端に至るDNA部分にのみEcoRIによる切断部位が一カ所存在し、且つまた、溶菌に関与する遺伝子が該遺伝子に変異したDNA断片(λcl857 Sam7 DNA由来)に組み換えられたために、宿主細菌を溶解する能力を欠出したバクテ

22

リオファージλcl857 1121Sを分解して得た。

【0090】(11) λcl857 1121Sの後期プロモーターより下流域で、その付着末端に至るDNA部分に存在するエンドヌクレアーゼ切断部位に、PTA遺伝子断片を挿入した組換え体バクテリオファージλEN1121S-PTAの調製

前項(10)で得られたバクテリオファージλcl857 1121SDNA 10μgおよび、前項で得られた組換え体プラスミドPAK222LLDNA 3μgを混合し、これを50mMトリス-HCl(pH7.4)/100mM NaCl/10mM MgSO₄の組成の溶液50μlに添加し、更に50ユニットのEcoRIを添加し、37℃で2時間作用させた後、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿処理を行い、沈殿物を得、これを50mMトリス-HCl(pH7.4)/10mM ジチオスレイトール/10mM MgCl₂/0.1mM ATPの組成の溶液8μlに添加し、4℃で18時間作用させて連結反応を行った。

【0091】得られたDNA 10μgを前記イン・ビトロ・パッケージング法によりバクテリオファージの被膜蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液50μlに、大腸菌1100(10⁹個/ml、0.5μl)を加え、30℃で30分間孵置した。これに、更にバクテリオファージλcb2(10¹⁰個/ml、0.1ml)を加え、30℃で30分間孵置した(この操作により非溶原菌は死滅する)。これをT-Y培地に撒き、32℃で16時間培養した。

【0092】尚バクテリオファージλcb2は、大腸菌K-12(λ)(ATCC12435)より、A.D.Kaiser(Virology、3巻、24頁、1957年)およびG.Kellenbergerら(J.Mol.Biol.、3巻、399~408頁、1961年)の方法により調製した。以上の如くして培養し、生育してきた菌株のうち、λcl857 1121SDNA上にpta遺伝子を保持する組換え体バクテリオファージDNAによる溶原菌を以下の方法で検索した。そして、数菌株のバクテリオファージDNA上にpta遺伝子を有する溶原菌を得た。

【0093】すなわち、上記により得られた溶原菌、すなわち、λcb2耐性且つ温度感受性菌を各々T-Y培地を用いて32℃で16時間振とう培養した。得た培養液0.5mlを150ml容の三角フラスコ中の10mlのT-Y培地に接種し、クレットユニット(Klett unit)が約100になったところで温度を43℃に上昇させて25分間振とうした後再び温度を32℃に降下させて約3時間振とう培養を続けた。

【0094】この様にして得た培養液のうち1mlを超音波破碎処理した物を細胞抽出液とし、前記記載の方法に従い、PTAの酵素活性を測定し、活性の高い菌株を選択した。この活性の高い溶原菌を、10mlのT-Y培地を用い32℃で振盪培養した。クレットユニットが約100になったところで温度を43℃に上昇させて25分

23

間振盪した後、再び温度を37℃に降下させて約3時間振盪培養した。該培養液より等容量のフェノール/クロロホルム混合溶媒を用いてDNAを抽出し、得られたDNAをエタノール沈殿させてDNAを得た。

【0095】この様にして得られたDNAをトリス-HCl (pH7.5)/1mM EDTA組成の溶液1mlに溶解した。該溶液4μlを10mMトリス-HCl (pH7.4)/100mM NaCl/10mM MgSO₄/1mM ジチオスレイトールの組成の溶液30μlに添加し、更に50ユニットのEcoRIおよび20μgのRNaseA (シグマ社製)を添加し、37℃で1時間作用させて消化した。これをアガロースゲル電気泳動処理し、DNA断片の大きさを分析した。

【0096】その結果、PTA高活性の溶原菌全てに、約4.6kbpの組換え体プラスミドPAK222LL DNA由来のDNA断片が検出された。以上の如くして大腸菌(E.coli)1100(λEN1121S-PTA)を分離し、所期の組換え体バクテリオファージλEN1121S-PTADNAの調製を行った。尚、図9に、項(9)～(11)に記載のλEN1121S-PTA作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0097】同一ベクターに遺伝子cysE、cysKを同時に含有した組換え体ファージDNAの調製(12)バクテリオファージλEN501S-Tcのコート蛋白質製造の遺伝子情報部分に存在するエンドヌクレアーゼ切断部位に、cysE、cysK遺伝子を挿入したバクテリオファージλEN501S-CYSの調製

前記載のバクテリオファージλEN501S-Tc DNA10μg及び前記載の組換え体プラスミドpOHC100T 3μgを混合し、これを50mMトリス-HCl緩衝液(100mM NaCl及び10mM MgSO₄含有、pH7.5)50μlに添加し、更に、50UのEcoRIを添加し、37℃で2時間反応させた。該反応物について、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿を行い、沈殿物を得た。これを50mMトリス-HCl緩衝液(10mM MgCl₂及び0.1mM ATP含有、pH7.4)8μlに添加し、更に2ユニットのT4DNAリガーゼを添加し、4℃で18時間作用させて連結反応を行った。

【0098】得られたDNA10μgをイン・ビトロ・パッケージング法によりλバクテリオファージの被覆蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液50μlに大腸菌1100(10⁹/ml、0.5μl)を加え30℃で3時間孵置した。これを、更に前記載の方法と同様にλcb2で処理し、更にTc(テトラサイクリン)耐性の菌株を選択することにより溶原菌を得た。この溶原菌をT-Y培地を用いて32℃で16時間振盪培養した。該培養液0.5mlを150ml容三角フラスコ中の10mlのT-Y培地に接種し、培養した。クレットユニットが約100になったところで温度を43℃の上昇させて25分間振盪培養した後、再度温度を32℃に降下させて約3時間振盪培養を続けた。

24

【0099】このようにして得た培養液のうち、1mlを超音波器による破碎処理をした。この破碎物を細胞抽出液とし、J. Gen. Microbiol. (128巻、1047～1052頁、1982年)に記載の方法に従い、SAT、OASLの酵素活性を測定した。そして、活性の高い株を選択した。この溶原菌より、前記載の方法と同様にしてDNAを抽出し、10ユニットのEcoRIで37℃で2時間消化した。該消化物のDNA断片の大きさを、アガロース電気泳動に掛け、分析した。その結果、SAT、OASL高活性の溶原菌は約2.1kbpのpOHC100T由来のDNA断片を保持していた。

【0100】以上の如くして大腸菌(E.coli)1100(λEN501S-CYS)を分離し、所期の組換え体バクテリオファージλEN501S-CYSの作製を行った。尚、図10に、項(12)に記載のλEN501S-CYS作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0101】同一ベクターにcysE、cysK、ptaを同時に含有する組換え体ファージDNAの調製

(13)大腸菌1100(501CYS×PTA)の調製

前記載のバクテリオファージλEN501S-CYS DNA10μgおよびλEN1121S-PTADNA 10μgを各々混合し、これを50mMトリス-HCl (pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール/100mM NaCl組成の溶液50μlに添加し、更に50ユニットのNheI(ベーリンガーマンハイム山之内社製)を添加し、37℃で2時間作用させた後、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿して沈殿物を得た。これを50mMトリス-HCl (pH7.4)/10mM MgCl₂/10mMジチオスレイトール/0.1mM ATPの組成の溶液8μlに添加し、更に2ユニットのT4DNAリガーゼ(ベーリンガーマンハイム山之内社製)を添加し、4℃で18時間作用させて、連結反応を行った。

【0102】得られたDNA10μgを前記イン・ビトロ・パッケージング法によりλバクテリオファージの被覆蛋白質で包み、バクテリオファージ粒子を調製した。このファージ粒子溶液50μlに大腸菌1100(10⁹/ml、0.5μl)を加え30℃で2時間孵置した。このものから、前記と同様にλcb2で処理し、溶原菌を得た。

【0103】該溶原菌は、1.5μg/mlのテトラサイクリン含有する培地で生育せず、ブランク形成能を欠失している株として選択した。この選択された組換え体DNAを含有する菌株より組換え体DNAを検出する方法を以下に示した。選択された組換え体DNAを含有する溶原菌をT-Y培地に接種して、クレットユニットが約100になったところで温度を43℃に上昇させて25分間振とうした後再び、温度を32℃に降下させて約3時間振とうを続けた。このようにして得られた培養液にクロロホルム50μlを添加し、更に温度32℃で20分間振とうを続け(この操作により溶菌する。)、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈殿を行いD

25

NAを抽出した。

【0104】このようにして得られたDNAを、前記の如くしてEcoRIで処理し、アガロース電気泳動にかけDNA断片の大きさを分析した。その結果、選択された溶原菌の保持する組換え体DNAは、cysE、cysK遺伝子を含むpOHC100Tおよびpta遺伝子を含むpAK222LL由来のDNA断片を保持することが判明した。以上の如くして大腸菌(E.coli)1100 (λ501CYS×PTA)を分離した。尚、図11に、項(13)に記載のλ501CYS×PTA作製の手順を制限酵素地図にて示した。

【0105】〔実施例2〕大腸菌形質転換体1100 (λ501CYS×PTA)株を用いるL-含硫アミノ酸の製造—前記載の大腸菌1100 (λ501CYS×PTA)株をT-Y培地(トリプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%)2ml中に接種し、30度で16時間振とう培養した。

【0106】得られた培養物1mlを、500ml容枝付き三角フラスコに分注し、滅菌した50mlのTY培地(トリプトン2%、酵母エキス1%、塩化ナトリウム0.75%、塩化マグネシウム1mM)に接種し、32℃で振盪培養し、クレットユニットが約100になったところで温度を42℃に上昇させて20分間振盪培養した。再び、温度を37℃に降下させて約4時間振盪培養を続けた。*

26

*【0107】培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁後超音波破碎し、粗酵素液とした。得られた粗酵素液(80μg蛋白質相当量)を、セリン20mM、アセチルCoA0.1mM(L-セリン1mmolあたり0.005mmolである)、アセチルリン酸40mM、硫化水素20mM、EDTA0.8mM、ピリドキサルリン酸0.2mMを含む10mMリン酸カリウム緩衝液0.5ml(pH7.5)に加え、30℃で30分間反応させた。反応終了後直ちにミリボア Ultra free C3GC (Mw=10000)を用いて膜濾過することにより菌体を除いた反応液を得た。

【0108】なお、上記反応液中のSAT活性は0.16U、OASL活性は3.7U、PTA活性は3.0Uであった。反応終了後の反応液中のL-含硫アミノ酸の含有量を測定して表1に示した(本発明1)。また、比較のため、cysEおよびcysK遺伝子のみを強化したプラスミドDNAを有する大腸菌1100株(λEN501S-CYS)についても同様にL-含硫アミノ酸の生成反応を行った(対照1)。これらの結果をまとめて表1に示した。

【0109】

【表1】

菌株	L-含硫アミノ酸生産量 (mM/30min.)
(本発明1) 大腸菌1100 (λ501CYS×PTA)	1.2
(対照1) 大腸菌1100 (λEN501S-CYS)	0.6

【0110】表1より、本発明により得られる、すなわち、大腸菌1100(501CYS×PTA)から得られる粗酵素液は、対照の粗酵素液に比してL-含硫アミノ酸の生産量が増加して、PTAの存在によるアセチルCoA再生系の強化の効果がでていることがわかる。なお、上記対照1において、L-含硫アミノ酸の製造量を本発明のものにするためには、アセチルCoAの反応液中の濃度を0.3mM(L-セリン1mmolあたり0.015mmol)にする必要があった。

【0111】〔実施例3〕大腸菌JM101(pOHE100)株、JM※

※101(pOHE100T)株、JM101(pOHC100)株およびJM101(pAK222LL)株を実施例2と同様に各々培養した。更に、各々の菌体について、実施例2と同様にして粗酵素液を調製した。各粗酵素液を、表2に示す活性になるように添加する以外は、実施例2と同様にL-含硫アミノ酸の生成反応を行った。そして、L-含硫アミノ酸の生産量を測定し、結果を表2に示した。

【0112】

【表2】

菌株	添加した 酵素の種類	添加した酵素 活性(U)	L-含硫アミノ酸 生産量(mM/30min.)
(本発明2)			
JM101(pOHE100T)株	SAT ^I	0.16	
JM101(pOHC100)株	OASL	3.7	0.95
JM101(pAK222LL)株	PTA	3.0	

27			28
(本発明3)			
JM101(pOHE100)株	SAT	16.0	
JM101(pOHK100)株	OASL	3.7	0.45
JM101(pAK222LL)株	PTA	3.0	
(対照2)			
JM101(pOHE100T)株	SAT ^I	0.16	
JM101(pOHK100)株	OASL	3.7	0.26
(対照3)			
JM101(pOHE100)株	SAT	16.0	
JM101(pOHK100)株	OASL	3.7	0.15

注1) SAT^I : L-システインによるフィードバック阻害を受けにくくなった酵素

【0113】表2から、本発明の方法による場合、L-含硫アミノ酸の生産量が対照のものに比べて、高いことがわかる。即ち、PTAを添加してアセチルCoA再生系を強化すると、L-含硫アミノ酸の生産量が増加している。また、SAT活性がL-システインによるフィードバック阻害を受けにくくなったものでは、その生産量がより顕著に増加しており（本発明3）、反応液に添加するSATの量も本発明2の約1/100でよいことがわかる。

*【0114】【実施例4】大腸菌1100 (λEN501S-CYS) 株、および1100 (λEN1121S-PTA) 株を実施例2と同様に各々培養した。更に、各々の菌体について、実施例2と同様にして粗酵素液を調製した。各粗酵素液を、表3に示す活性になるように添加する以外は、実施例2と同様にL-含硫アミノ酸の生成反応を行った。そして、L-含硫アミノ酸の生産量を測定し、結果を表3に示した。

【0115】

* 【表3】

菌株	添加した 酵素の種類	添加した酵素 活性 (U)	L-含硫アミノ酸 生産量 (mM/30min.)
(本発明4)			
1100 (λEN501S-CYS) 株	SAT ^I	0.16	
	OASL	3.7	0.88
1100 (λEN1121S-PTA) 株	PTA	3.0	
(対照4)			
1100 (λEN501S-CYS) 株	SAT ^I	0.16	
	OASL	3.7	0.30

注1) SAT^I : L-システインによるフィードバック阻害を受けにくくなった酵素

【0116】表3から、本発明の方法による場合、L-含硫アミノ酸の生産量が対照のものに比べて、高いことがわかる。即ち、PTAを添加してアセチルCoA再生系を強化すると、L-含硫アミノ酸の生産量が増加している。

【0117】

【発明の効果】本発明によれば、SAT、PTAおよびOASL生産能に優れた形質転換体を用いることにより、L-セリンからL-含硫アミノ酸を簡便に、しかも従来法と比較して、高収率で製造することができる。しかも、PTAとアセチルリン酸との存在下で反応を行うことから、大量のアセチルCoAを添加する必要がなく、L-含硫アミノ酸を安価に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

※【図1】pta遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出されたPTAのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】pta遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出されたPTAのアミノ酸配列を示す図である（つづき）。

【図3】pta遺伝子の塩基配列および該塩基配列から導き出されたPTAのアミノ酸配列を示す図である（つづき）。

【図4】cysE遺伝子の塩基配列を示す図である。

【図5】cysK遺伝子の塩基配列を示す図である。

【図6】pAK222LL作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

【図7】pOHE100T作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

※50 図である。

29

【図8】p0HK100 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

【図9】λEN1121S-PTA作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

30

【図10】λEN501S-CYS作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

【図11】λ501CYS×PTA 作製の手順を制限酵素地図にて示した図である。

【図1】

```

CTGCCTGATTTCACACGCCAGCTCAGCTGTGTGTTTGTAAACCGCCAAATCGCGGTAAACGAAGAGGATAAACCGTGT 80
S R I I M L I P T G T S V G L T S V A W R D P C N G T 28
CCCGTATTATTATGCTGATCCCTACCGGAACCGCTCGGTCTGACCGAGCTAGCTTGCGGTGATCCGTGCAATGGAACG 160
Q R R S S E R F Q T Y R S A A Y R W R C A D Q T T T I 55
CAAAGGCGTTTCGTCTGAGCGTTTTCAAACCTATCGCTCAGCCGCGTACCGGTGCGGATGCGCCGATCAGACTACGACTAT 240
V R A H S S T T T A A E P L K M S Y V E G L L S S N 81
CGTGCGTGCAGACTCTTCCACCAGCAGCGCCGCTGAACCGCTGAAATGAGCTACGTTGAAGGCTGCTTTCCAGCAATC 320
Q K D V L M E E I V A N Y H A N T K D A E V V L V E G 108
AGAAAGATGTGCTGATGGAAGAGATCGTCGCAAACTACCACGCTAACACCAAGACGCTGAAGTGGTTCTGGTTGAAGGT 400
L V P T E K H Q F A Q S L N Y E I A K T L N A E I V F 135
CTGGTCCCGACACGTAAGCACCAGTTTGCCTCAGTCTCTGAACCTACGAAATCGCTAAACCGCTGAATGCGGAAATCGTCTT 480
V M S Q G T D T P E Q L K E R I E L T R N S F G G A 161
CGTTATGTCTCAGGGCACTGACACCCCGGAACAGCTGAAAGAGCGTATCGAATGACCCCGACAGCTTCGCGCGTGCCA 560
K N T N I T G V I V N K L N A P V D E Q G R T R P D L 188
AAAACACCAACATCAGCGCGTTATCGTTAACAACGTAACGACCGGTTGATGAACAGGTCGTAATCGCCCGGATCTG 640
S E I F D D S S K A K V N N V D P A N V Q E S S P L P 215
TCCGAGATTTTCAGCACTCTTCCAAAGCTAAAGTAACAATGTTGATCGCGGACGCTGCAAGAAATCCAGCCCGCTGCC 720
V L G A V P M S F D L I A T R A I D M A R H L N A T 241
GGTTCTCGCGCGTGTGCGCTGGAGCTTTGACCTGATCGCGACTCGTGCGATCGATGCTGCGCCACCTGAATCGGACCA 800
I I N E G D I N T R R V K S V T F C A R Q H S A H A G 268
TCATCAACGAAGCGGACATCAATACTCGCGCGTTAAATCGCTCACTTTCTGCGCACGCCAGCATTCGCGACATGCTGGA 880

```

p t a 遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列

【図2】

```

A L R A G S L L V T S A D R P D V L V A A C L A A M N 295
GCACTTCGTGCGCGTTCTGCTGGTGACTTCCGACAGCCGTCCTGACGTGCTGGTGGCCGCTTGCCCTGGCAGCCATGAA 960
G V E I G A L L L T G G Y E M D A R I S K L C E R A 321
CGGCGTAGAAATCGGTGCCCTGCTGCTGACTGGCGGTTACGAAATGGACCGCGCATTTCTAAACTGTGCGAACGTGCTT 1040
F A T G L P V F M V N T N T W Q T S L S L Q S F N L E 348
TCGCTACCGCGCTGCGCGTATTTATGGTGAACACCAACACCTGGCAGACCTCTCTGAGCCTGCAGAGCTTCAACCTGGAA 1120
V P V D D H E R I E K V Q E Y V A N Y I N A D W I E S 375
GTTCGCGTTGACGATCAGCAACGTAACGAGAAAGTTACGGAATACGTGCTAATACATCAACCGCTGACTGATCGAATC 1200
L T A T S E R S R R L S P P A F R Y Q L T E L A R K 401
TCTGACTGCCACTTCTGAGCGCAGCGCTGCTGCTCTCGCGCTGCGTTCCGTATACAGCTGACTGAACCTGCGCGCAAAG 1280
A G K R I N L P E G D E P R T V K A A A I C A E R G I 428
CGGCGAAACGTATCTGACTGCCGGAAGGTGACGAACCGCGTACCGTTAAGCAGCGCTATCTGTGCTGAACGTGGTATC 1360
A T C V L L G N P A E I N R V A A S Q G V E L G A G I 455
GCAACTTGGCTACTGCTGGTAATCCGCGCAGAGATCAACCGTGTTCGAGCGTCTCAGGGTGTAGAAGTGGGTGACGGGAT 1440
E I V D P E V V R E S Y V G R L V E L R K N K G M T 481
TGAAATCGTTGATCCAGAAGTGGTTCCGGAAGCTATCTTGGTCTGCTGGTGAACCTGCGTAAGAACAAGGCATGACCG 1520
E T V A R E Q L E D N V V L G T L M L E Q D E V D G L 508
AAACCGTTCGCCCGAAGCTGGAAGACAACGTGGTCTCGGTACGCTGATGCTGGAACAGGATGAAGTTGATGGTCTG 1600
V E G A V H T T A N T I R P P L Q L I K T A P G S S L 535
GTTTCGGGTGCTGTCACACTACCGCAACACCATCCGTCGCCGCTGACGCTGATCAAACTGCACCGGCGAGCTCCCT 1680
V S S V F F M L L P E Q V Y V Y G D C A I N P D P T 561
GGTATCTTCGCTGCTTCTATGCTGCTGCGGAACAGGTTTACGTTTACGGTGACTGTGCGATCAACCGGATCCGACCG 1760
A E Q L A E I A I Q S A D S A A A F G I E P R V A M L 588

```

p t a 遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列 (つづき)

【図3】

```

CTGAACAGCTGGCAGAAATCGCGATTGATTCGGCTGCTGGCTTCGGTATCGAACCGCGCGTGTCTATGCTC 1840
S Y S T G T S G A G S D V E K V R E A T R L A Q E K R 615
TCCTACTCCACCGCTACTTCTGCTGAGGTAGCGACGTAGAAAAAGTTCGCGAAGCAACTCGTCTGGCGCAGGAAAAACG 1920
P D L H I D G P L Q Y D A A V N A D V A K S K A P N 641
TCCTGACCTGATGATCGAGGTGCGCTGAGTACGACGCTGCGGTAAATGGTACGTTGCGAAATCCAAAGCGCGAACT 2000
S P V A G R A T V F I F P D L N T G N T T Y K A V Q R 668
CTCCGGTTGACAGGTGCGCTACCGTGTTCATCTCCCGGATCTGAACACCGGTAAACACCACTACAAGCGGTACAGCGT 2080
S A D L I S I G P H L Q G H R K P V N D L S R G A L V 695
TCTGCCGACCTGATCTCCATCGGGCCGATGCTGAGGATGTCGCAAGCGGTTAACGACCTGTCCCGTGGCGCACTGGT 2160
D D I V Y T I A L T A I O S A Q Q Q 713
TGACGATATCGTCTACACCATCGCGCTGACTGCGATTGAGTCTGCACAGCAGCAGTAATCTCGTTCATCGCAGCTTTC 2240
CGCTGCCGATATCTGAACCGAAATATCACTATTCGGTATTTTATCTCTTAATTGCAATTAATCTTCTGATAT 2320
CTTGCTTAATCGCGTGCATCAATGAATTCGCCATCCCACTTTGCATACCTTACCACCTTTCGTTTGTGCAAGGAAATAT 2400
TGCGCTATGTCGCGAATCACTGAATCCAAACCAAGAAGATGGCAATGCCGATACGTTGGTGATTATCTTTTTTGT 2480
TGCTATTTTAAACAGCGCTTCCACCTGCGTAGTTCGCGTGGGATGTTTGACAGTCAGGAAGTCAGTATCAGGTTGATG 2560
GTCAAAACAAAACACGCAAGTCGTAGATCCAAACCCATTTCGCGGATTCGTACACCTAACCGAAACAGGCCCGAAC 2640
CTGAAGTATCAACCGCGATCAGCTGTTCACGACGCGCGATGAACGCCCGGG 2694

```

D t s 遺伝子の塩基配列およびPTAのアミノ酸配列 (つづき)

【図4】

```

10 20 30 40 50 60
ATGTCGTGTG AAGAACTGGA AATTGCTGCG AACAAATATTA AAGCCGAAGC CAGAACCGTG
70 80 90 100 110 120
CGCGACTGTG AGCCAATGCT GCCCAGTTTT TACCACGCGA CGCTACTCAA GCACGAAAC
130 140 150 160 170 180
CTTGGCAGTG CACTGAGCTA CATGCTGGCG AACAAAGTGT CATCGCCAAT TATGCTGCT
190 200 210 220 230 240
ATTGCTATCC GTGAAGTGT GGAAGAAGCC TACCGCGCTG ACCCGGAAAT GATCGCTCT
250 260 270 280 290 300
CGCGCGCTGT ATATTACGG GGTGCGTACC CGCGACCGCG CAATCGATAA ATACTCAAC
310 320 330 340 350 360
CGGTTGTAT ACCTGAAGGG TTTTCATGCC TTGCAAGGCT ATCGCATCG TCACTGCTTG
370 380 390 400 410 420
TGAATCAGG GCGCTCGCGC ACTGGCAATC TTTCTGCAAA ACCAGGTTTC TGTGACGTT
430 440 450 460 470 480
CAGGTCGATA TTCACCGCGC AGCAAAATTT GGTGCGGTA TCATGCTGA CCACGCGACA
490 500 510 520 530 540
CGCATCGTCG TTGGTGAAC GCGCGTGATT GAAACGACG TATCGAATCT GCAATCTGTG
550 560 570 580 590 600
ACGCTTCGCG GTACGGGTAA ATCTGGTGGT GACCGTCACC CGAAATTCG TGAAGGTGTG
610 620 630 640 650 660
ATGATTGCGC CGGCGCGGAA AATCTCTGCG AATATTGAAG TTGGCGCGCG CGCGAAGATT
670 680 690 700 710 720
GCGCGAGGTT CCGTGTGTCT GCAACCGGTG CGGCGCGATA CCACGCGCGC TGGCGTTCG
730 740 750 760 770 780
GCTGCTATTG TCGGTAACCC AGACAGCGAT AAGCCATCAA TGGATATGGA CCAGCATTTG
790 800 810 820
AACCGTATTA ACCATACATT TGAGTATGGG GATGGGATCA ATGTT

```

※注コフィン

c y s E 遺伝子の塩基配列

【図5】

```

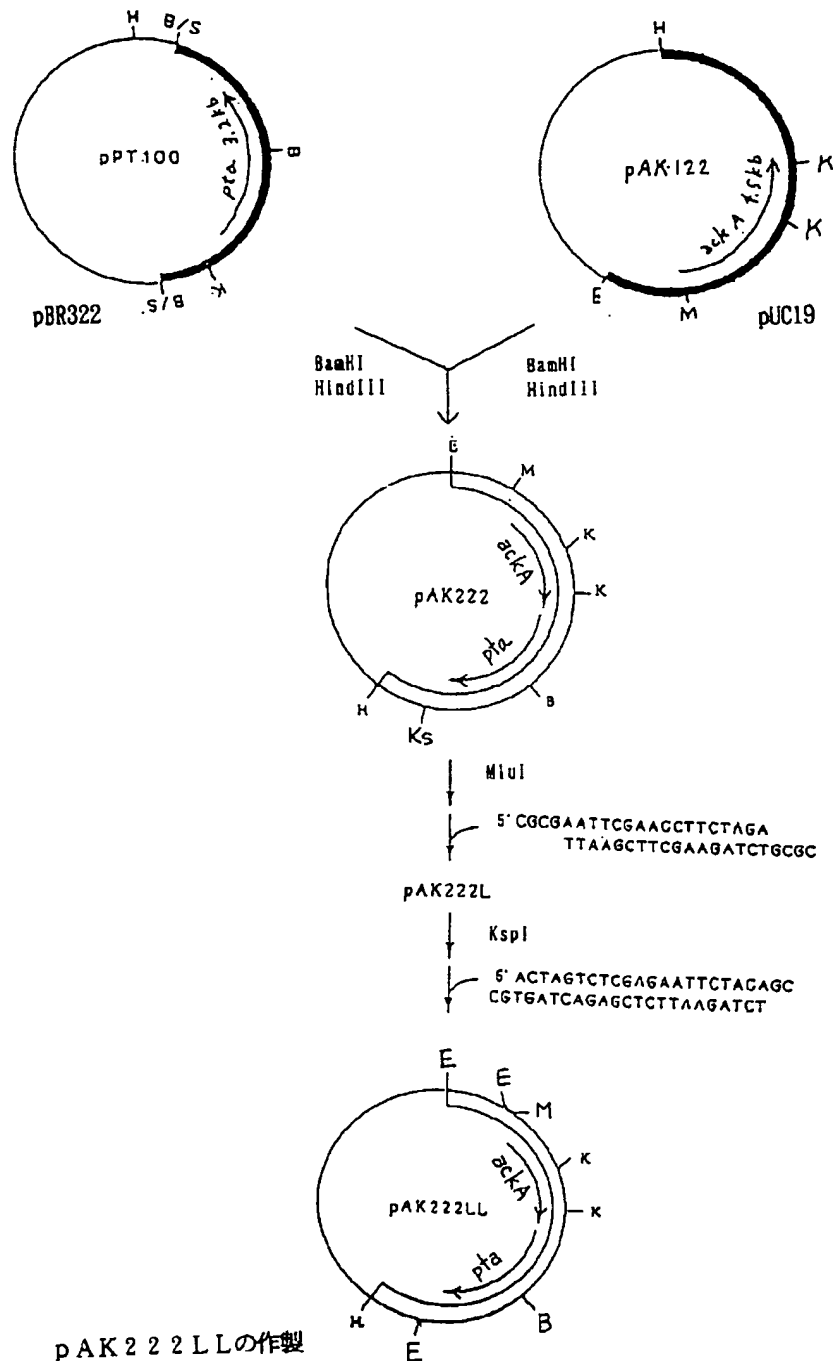
10 20 30 40 50 60
ATGTCGTGTG AAGAACTGGA AATTGCTGCG AACAAATATTA AAGCCGAAGC CAGAACCGTG
70 80 90 100 110 120
CGCGACTGTG AGCCAATGCT GCCCAGTTTT TACCACGCGA CGCTACTCAA GCACGAAAC
130 140 150 160 170 180
CTTGGCAGTG CACTGAGCTA CATGCTGGCG AACAAAGTGT CATCGCCAAT TATGCTGCT
190 200 210 220 230 240
ATTGCTATCC GTGAAGTGT GGAAGAAGCC TACCGCGCTG ACCCGGAAAT GATCGCTCT
250 260 270 280 290 300
CGCGCGCTGT ATATTACGG GGTGCGTACC CGCGACCGCG CAATCGATAA ATACTCAAC
310 320 330 340 350 360
CGGTTGTAT ACCTGAAGGG TTTTCATGCC TTGCAAGGCT ATCGCATCG TCACTGCTTG
370 380 390 400 410 420
TGAATCAGG GCGCTCGCGC ACTGGCAATC TTTCTGCAAA ACCAGGTTTC TGTGACGTT
430 440 450 460 470 480
CAGGTCGATA TTCACCGCGC AGCAAAATTT GGTGCGGTA TCATGCTGA CCACGCGACA
490 500 510 520 530 540
CGCATCGTCG TTGGTGAAC GCGCGTGATT GAAACGACG TATCGAATCT GCAATCTGTG
550 560 570 580 590 600
ACGCTTCGCG GTACGGGTAA ATCTGGTGGT GACCGTCACC CGAAATTCG TGAAGGTGTG
610 620 630 640 650 660
ATGATTGCGC CGGCGCGGAA AATCTCTGCG AATATTGAAG TTGGCGCGCG CGCGAAGATT
670 680 690 700 710 720
GCGCGAGGTT CCGTGTGTCT GCAACCGGTG CGGCGCGATA CCACGCGCGC TGGCGTTCG
730 740 750 760 770 780
GCTGCTATTG TCGGTAACCC AGACAGCGAT AAGCCATCAA TGGATATGGA CCAGCATTTG
790 800 810 820
AACCGTATTA ACCATACATT TGAGTATGGG GATGGGATCA ATGTT

```

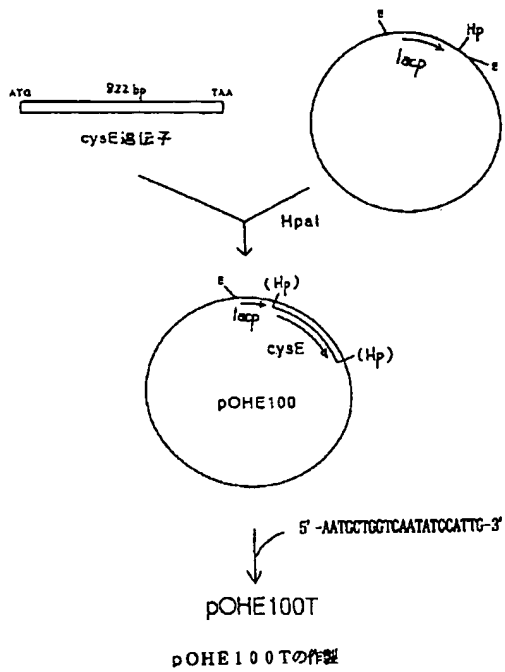
※注コフィン

c y s E 遺伝子の塩基配列

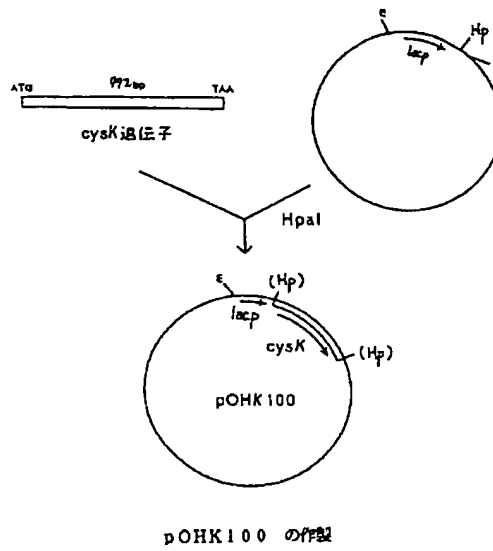
【図6】



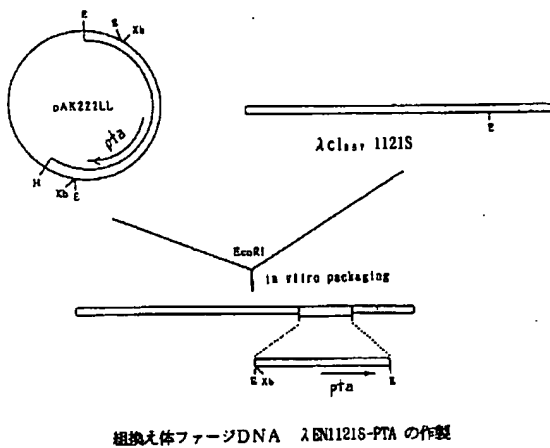
【図7】



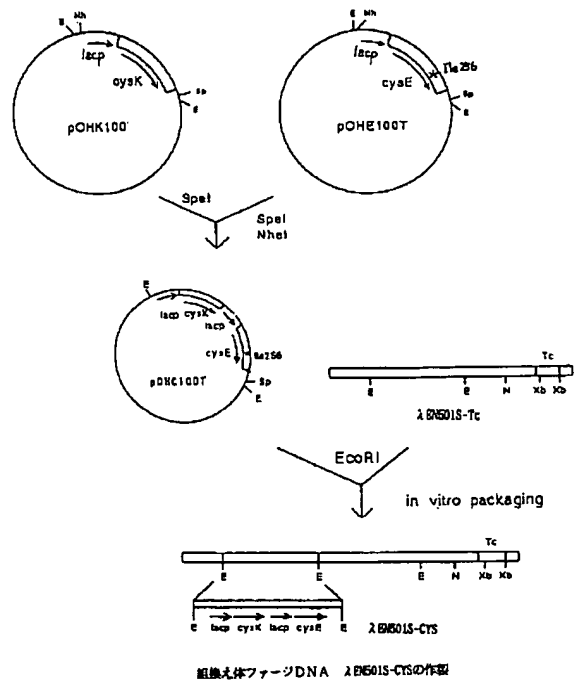
【図8】



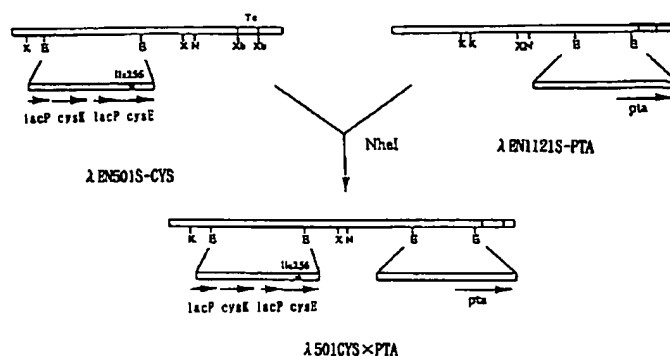
【図9】



【図10】



【図11】



組換え体ファージDNA λ501CYS×PTA の作製

【手続補正書】

【提出日】平成8年7月5日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正内容】

【0050】有機溶剤としては、トルエン、キシレン、アセトン、脂肪族アルコール、ベンゼンあるいは酢酸エチルなどを用いることができる。これらは、通常、反応液1ml当たり、0.1～50μl、好ましくは1～20μlの

濃度で用いられる。反応温度は、通常10～60℃、好ましくは20～50℃、特に好ましくは36～48℃であり、pHは通常5～9、好ましくは6～8.5である。また、反応は、通常、1～80時間で完了する。なお、反応中、反応液に通気等の操作で酸素を供給することにより、生成したL-システインをL-シスチンに変換することができる。また、L-システインによるSAT活性のフィードバック阻害を解除することができる。そのために、L-含硫アミノ酸の反応収率は高められる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/88			C 1 2 N 9/88	
15/09		9162-4B	15/00	A
(C 1 2 P 13/12				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 大竹 秀子
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内

(72)発明者 中野 衛一
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内